

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/38325 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. September 1998 (03.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/00593 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 1998 (27.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 07 971.7 27. Februar 1997 (27.02.97) DE 198 08 438.2 27. Februar 1998 (27.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND, letztvertreten durch den PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRLICH-INSTITUTS [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D-63225 Langen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus [DE/DE]; Großer Hasenpfad 114, D-60598 Frankfurt am Main (DE). STITZ, Jörn [DE/DE]; Weberstrasse 25, D-60318 Frankfurt am Main (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: RETROVIRAL VECTORS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND THE USE THEREOF FOR GENE TRANSFER IN CD4-POSITIVE CELLS (54) Bezeichnung: RETROVIRALE VEKTOREN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG ZUR GENÜBERTRAGUNG IN CD4-POSITIVE ZELLEN (57) Abstract <p>The invention relates to the production and use of retroviral vectors for cell-type specific gene transfer, specially to a production method of retroviral vectors containing capsid particles of murine leukemia virus (MLV) and envelope proteins of human immunodeficiency viruses (HIV) or simian immunodeficiency viruses (SIV). Said vectors can be used for gene transfer in selected cell types, specially in CD4-positive mammal cells.</p> (57) Zusammenfassung <p>Beschrieben ist die Herstellung und Verwendung retroviraler Vektoren für zelltypspezifischen Gentransfer, insbesondere ein Herstellungsverfahren von retroviralen Vektoren, die Kapsidpartikel des murinen Leukämievirus (MLV) und Hüllproteine humaner Immunschwächeviren (HIV) oder Affen-Immunschwächeviren (SIV) enthalten. Diese Vektoren können für die Gentransfer in ausgewählte Zelltypen, speziell in CD4-positive Säugerzellen verwendet werden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur
Genübertragung in CD4-positive Zellen

Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektoren (Zell-Targeting-Vektoren), Verfahren zu
5 ihrer Herstellung und ihrer Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive Zellen.

Der Ausdruck "retrovirale Vektoren" oder "retrovirale Transfervektoren" bezeichnet infektiöse
aber vermehrungsunfähige Retroviren, die Gene in Form von retroviralen Expressionskonstrukten
(auch Expressionsvektoren genannt) in Zellen einschleusen können. Die Genübertragung führt zur
10 Integration des Expressionskonstrukts in das Genom der Zelle. Der retrovirale Gentransfer ist
vorteilhaft, weil (i) in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in Zellen überführt wird, (ii)
das Gen im allgemeinen ohne Mutationen oder Umlagerungen transferiert wird und (iii) ein
stabiler chromosomaler Einbau erfolgt.

15 Es ist bekannt, retrovirale Vektoren auf der Basis des amphotropen murinen Leukämievirus
(MLV) zu benutzen, um bestimmte Gene in Säugerzellen, insbesondere in humane Zellen, zu
überführen. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine
Replikationsrunde. Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man zwei Komponenten. Zum
einen benötigt man eine Verpackungszelle, welche die *gag*-, *pol*- und *env*-Genprodukte des MLV
20 durch Expression psi-negativer Konstrukte bereitstellt, so daß diese Gene nicht in ein Retrovirus
verpackt werden können. Als "psi" wird das Verpackungssignal der Retroviren bezeichnet, das die
effiziente Verpackung der Boten-RNA steuert. Zum anderen muß ein sogenanntes
Expressionskonstrukt hergestellt werden, das eine Verpackung in den retroviralen Vektor und den
Transfer durch das Retrovirus erlaubt und das eine kodierende und translatierbare Region des
25 gewünschten Genprodukts enthält. Somit muß das Expressionskonstrukt das Verpackungssignal
psi enthalten. Die in der unbehandelten Verpackungszelle befindlichen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene
müssen psi-negativ sein, damit entsprechende Boten-RNA nicht in die Retroviruspartikel
aufgenommen wird. Nach der Überführung des Expressionskonstrukts durch Transfektion der
entsprechenden Vektor-DNA in die Verpackungszellen werden in den Zellüberstand retrovirale
30 Vektorpartikel abgegeben, die ausschließlich das Expressionskonstrukt enthalten, nicht jedoch die
psi-negativen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene, so daß diese Gene nicht in Zielzellen überführt werden.

Der Tropismus der retroviralen Vektoren, d. h. die Auswahl der Säugerzellen, in welche diese Vektoren das Expressionskonstrukt überführen können, wird durch das *env*-Gen in der benutzten Verpackungszelle bestimmt. Das *env*-Gen wird in Hüllproteine, das Transmembranprotein (TM) und das Oberflächenhüllprotein (SU) translatiert, welche die äußere Hülle des retroviralen Vektors bilden. Die *env*-Genprodukte des amphotropen MLV, das bisher vor allem für den Gentransfer benutzt wird, erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Speziell für den Gentransfer in humane Zellen erlaubt der amphotrope retrovirale Vektor jedoch nicht den selektiven Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger, weil das den Eintritt amphotroper retroviraler Vektoren und den Gentransfer vermittelnde Empfängerprotein (Rezeptor) für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen auf fast allen diesen Zellen zu finden ist.

Im Rahmen der Gentherapie steht zur Zeit die stabile Übertragung unterschiedlicher Gene in Zellkultur, d. h. "ex vivo", im Vordergrund. Verbesserungen der retroviralen Vektoren wurden bisher erreicht, indem statt des retroviralen *env*-Gens des MLV die *env*-Gene anderer Retroviren in die Verpackungszelle eingebracht wurden. Beispielsweise wurden statt des MLV *env*-Gens die *env*-Gene des G-Proteins des "vesicular stomatitis virus (VSV)" (Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8033-8037) benutzt. Die resultierenden retroviralen Vektoren zeigten unter anderem eine erhöhte Stabilität. In der WO 96/17071 sind retrovirale Vektoren beschrieben, die statt des MLV *env*-Gens das *env*-Gen des "human spumaretrovirus (HSRV)" enthalten. HSRV zeigt jedoch wie amphotropes MLV keinerlei Spezifität bei der Infektion von Zellen. Alle bisher untersuchten Säugerzellen sind, unabhängig vom Spenderorganismus oder dem Zelltyp, permissiv für eine Infektion mit HSRV (Schweizer et al, *J. Virol.* 71 (1997), 4821-4824, und Russel et al., *J. Virol.* 70 (1996), 217-222). Auch der mögliche Einsatz der *env*-Gene des "simian sarcoma associated virus" (Takeuchi et al., *Virology* 186 (1992), 792-794), des "feline leukemia virus, subgroup B" (Porter et al., *Hum. Gene Ther.* 7 (1996), 913-919), des "feline endogenous virus RD114" (Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436) und des "human T-cell leukemia virus I (HTLV-I)" (Vile et al., *Virology* 180 (1991), 420-424) deutete sich in bestimmten Experimenten an. Versuche zur Herstellung retroviraler Vektoren, welche das *env*-Gen der Lentiviren HIV-1, HIV-2 oder "simian immunodeficiency virus (SIV)" enthielten, waren bisher nicht erfolgreich. Derartige retrovirale Vektoren würden die Kernproteine, codiert von der *gag*-Region des MLV, und die Hüllproteine, codiert von der *env*-Region eines anderen Retrovirus, beispielsweise des HIV oder SIV, enthalten.

Für den selektiven Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen stehen bisher keine Vektoren zur Verfügung. Der vorliegenden Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, retrovirale Vektoren in Formen bereitzustellen, die nicht den amphotropen Rezeptor der Säugerzellen, sondern andere, nur in bestimmten Geweben und Zelltypen exprimierte Rezeptoren ansteuern. Diese Vektoren sind für eine spezifische Genübertragung in ausgewählte Zelltypen von Säugern geeignet. Eine weitere Aufgabe ist es, ein Verfahren zur Herstellung solcher retroviralen Vektoren zu entwickeln.

- 10 Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung retroviraler Vektoren umfassend Viruskern und Virushüllen gelöst, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Viruskern vom murinen Leukämievirus (MLV) und die Virushüllen von menschlichen Immunschwächeviren (HIV) oder Affen-Immunschwächeviren (SIV) stammen. Insbesondere sind die retroviralen Vektoren dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen vom menschlichen
- 15 Immunschwächevirus 1 oder 2 (HIV-1 bzw. HIV-2) oder vom Affen-Immunschwächevirus [z.B. *Cercopithecus aethiops* (SIVagm), *Macaca mulatta* (SIVmac), *Pan troglodytes* (SIVcpz), *Cercopithecus mitis* (SIVsyk), *Papio sphinx* (SIVmnd), *Cercocebus atys* (SIVsm) oder *Macaca nemestrina* (SIVmne)] stammen. Besonders bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen
- 20 Hüllproteins enthalten. Insbesondere bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten, das durch den C-Terminus oder ein beliebiges Fragment des transmembranen Proteins des murinen Leukämievirus (MLV) oder eines anderen Retrovirus verlängert worden ist.
- 25 Weiterhin werden Verpackungszellen bereitgestellt, in denen das psi-negative Hüllprotein-Gen (*env*) der Lentiviren HIV oder SIV und die psi-negativen *gag/pol*-Gene des MLV exprimiert werden. Diese Verpackungszellen enthalten weiterhin psi-positive Expressionskonstrukte, welche mit Hilfe der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren übertragen werden.
- 30 In einer Ausführungsform der Erfindung können Viruskern, die von einem definierten Retrovirus stammen, im Zusammenhang mit Expressionskonstrukten zur Herstellung der retroviralen Vektoren benutzt werden, die aufgrund ihrer Eigenschaften, hier aufgrund des Vorhandenseins des Verpackungssignals psi, in die Viruskern aufgenommen werden. Die Viruskern mit den zu

übertragenden Expressionskonstrukten werden ummantelt von fremden Virushüllen, die von einem anderen Virustyp oder aus einer anderen Zelle stammen. Die Expressionskonstrukte werden dann mit Hilfe der retroviralen Vektoren übertragen. Der Einbau der fremden Virushülle kann z.B. durch die Verwendung der vorzugsweise verkürzten Form des transmembranen Hüllproteins des HIV-1 *env*-Gens pTr712 vermittelt werden. Ferner kann der Einbau der fremden Virushülle z.B. durch die Verwendung der verkürzten Form des transmembranen Hüllproteins des SIVagm3 *env*-Gens $\Delta 0env$ vermittelt werden. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können Vollängen-Transmembranproteine oder modifizierte Transmembranproteine durch Anhängen des C-Terminus des transmembranen Hüllproteins des MLV oder der C-Termini der transmembranen Hüllproteine andere Viren an die verkürzten oder an die Vollängen-Transmembranproteine verwendet werden. Diese modifizierten Hüllproteine können in Vektoren aufgenommen werden. Besonders bevorzugt für solche Vektoren sind von MLV abgeleitete Kapsidpartikel, welche die Hüllproteine anderer Retroviren, insbesondere anderer Lentiviren wie HIV oder SIV enthalten. Diese Vektoren infizieren den gewünschten Zelltyp über den zellulären Rezeptor des Virus, von welchem die fremde Hülle abstammt.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform wird eine beliebige Zelle mit einem psi-negativen Expressionsgen für *gag*- und *pol*-Gene transfiziert. Ferner kann die Zelle mit einem Expressionskonstrukt, umfassend ein psi-Verpackungssignal und die in eine Zielzelle zu überführende genetische Information, transfiziert werden. Die Zelle wird dann mit einem weiteren Expressionsgen transfiziert, das die genetische Information für fremde Hüllproteine enthält. Die so hergestellte Zelllinie produziert retrovirale Vektoren, die die zu überführende genetische Information enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die MLV-*env*-negative Verpackungszelllinie TELCeB6 (Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436) mit dem verkürzten HIV-1 *env*-Gen pTr712 des Plasmids pLBAc/*env*-Tr712-neo (Wilk et al., *Virology* 189 (1992), 167-177; Kräusslich et al., *Virology* 192 (1993), 605-617) transfiziert. Dabei entsteht eine Verpackungszelllinie, die die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren des Typs MLV(HIV-1) in den Zellkulturüberstand abgibt. Diese Vektoren enthalten Kapsidpartikel, die aufgrund der Expression des *gag/pol*-Gens des MLV in der Zelle entstehen, sowie Hüllproteine des HIV-1, welche durch die intrazelluläre Expression der verkürzten Fassung Tr712 des HIV *env*-Gens in die Vektorpartikel aufgenommen werden. Die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten das

Vollängen-Oberflächenprotein gp120-SU des HIV-1 und die verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins, dessen kodierender Anteil aufgrund eines Stopkodons (Position 712) entsteht. Im einzelnen wurde nachgewiesen, daß dies zur Herstellung retroviraler Vektoren für den selektiven Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen führte. CD4-positive, nicht jedoch CD4-negative Zellen zweier ansonsten identischer Linien konnten mit den Vektoren spezifisch transduziert werden, d. h. das Expressionskonstrukt-Gen wurde überführt. Die Transduktion wurde in Gegenwart von Antikörpern gehemmt, welche die Infektion mit HIV ebenfalls hemmen. Das Oberflächenhüllprotein des HIV wurde auf der Oberfläche der hergestellten Gentransfervektoren nachgewiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die MLV-*env*-negative Verpackungszelllinie TELCeB6 mit dem verkürzten SIVagm3 *env*-Gen $\Delta 0env$ transfiziert. Die erhaltene Verpackungszelllinie sezerniert die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren des Typs MLV(SIVagm3) in den Zellkulturüberstand. Diese Vektoren enthalten ebenfalls Kapsidpartikel des MLV und Hüllproteine des SIVagm3, welche durch die intrazelluläre Expression der verkürzten Fassung $\Delta 0env$ des SIVagm3 *env*-Gens in die Vektorpartikel aufgenommen werden.

Die vorliegende Erfindung eröffnet somit die folgenden Möglichkeiten:

- Gene in CD4-positive Säugerzellen selektiv zu überführen,
- weitere Effizienzsteigerungen des Gentransfers durch Verbesserung der *env*-Genkonstrukte in vergleichbaren Verpackungszellen zu erreichen,
- Gentherapiestrategien zu entwickeln, für die ein selektiver Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen notwendig oder hilfreich erscheint,
- insbesondere Gentherapiestrategien zur Behandlung oder Prophylaxe der HIV-Infektion des Menschen zu entwickeln, wobei HIV-hemmende Gene, z.B. Antisensegene, RNA-Ködergene oder transdominant-negative mutante Gene des HIV oder anderer Lentiviren in CD4-positive Zellen überführt werden,
- insbesondere Gentherapiestrategien zur Einführung von Genen in CD4-positive Zellen zu entwickeln, zur Behandlung oder Prophylaxe von Erbkrankheiten, wie z.B. der ADA-Defizienz oder anderen genetisch behandelbaren Krankheiten, bei denen die Einführung in bestimmte Zellen vorteilhaft ist, und
- den Eintritt von Lentiviren in Säugerzellen im Detail zu untersuchen.

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung.

Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip der Übertragung von Genen mit Hilfe retroviraler Vektoren in Säugerzellen.

Abbildung 2 zeigt ein Schema der Herstellung eines retroviralen Vektors (entnommen aus "Molecular Biotechnology", Principles and Applications of Recombinant DNA, B.R. Glick und J.J. Pasternak, ASM Press, Washington, D.C., 1994, Seite 411, und ins Deutsche übertragen).

Abbildung 3 zeigt schematisch einen allgemein anwendbaren Herstellungsweg für retrovirale Vektoren (retrovirale Transfervektoren) durch Transfektion einer zunächst Expressionskonstrukt-negativen Verpackungszelle mit einem Expressionskonstrukt, das aufgrund des Vorhandenseins des Verpackungssignals (hier: psi) das zu übertragende Gen (therapeutische Gensequenz) in die retroviralen Vektoren einschleust.

Abbildung 4 zeigt einen speziellen Herstellungsweg für retrovirale Vektoren des Typs MLV(HIV-1). Dargestellt sind das MLV *gag/pol*-Expressions-Gen und das psi-positive Expressionskonstrukt pMFGInsLacZ, welche von der MLV *env*-negativen Verpackungszelle TELCeB6 exprimiert werden. Die *env*-Genvariante des HIV-1 (Tr712), welche die für das Vollängenoberflächen-Hüllprotein gp120-SU und die verkürzte Version des transmembranen Hüllproteins (Δ gp41-TM) kodierenden Regionen enthält, wird bei der Herstellung der MLV(HIV-1)-Vektoren ebenfalls in dieser Zelle exprimiert.

Abbildung 5 zeigt den generellen Aufbau von retroviralen Vektoren, welche den Viruskern eines bestimmten Virus in Kombination mit der Virushülle eines anderen Virus enthalten, erläutert am Beispiel der MLV(HIV-1)-Vektoren.

Abbildung 6 zeigt schematisch das Klonierungsschema zur Klonierungsstrategie des SIVagm3 *env*-Expressionskonstrukts pRep *wt env* und der verkürzten *env*-Gene, erläutert am Beispiel der Variante $\Delta 0 env$.

Abbildung 7 zeigt schematisch das Klonierungsschema zur Klonierungsstrategie der SIVagm3 *env*-Fusionsgene $\Delta 0MLV\ env$ und $\Delta 7MLV\ env$.

Abbildung 8 zeigt die Nukleinsäuresequenzen der zur Klonierung der SIVagm3 *env*-
5 Expressionskonstrukte verwendeten Oligonukleotide. Die Nukleinsäuresequenzen der Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Abbildung 9 zeigt schematisch die transkriptionellen Einheiten der SIVagm3 *env*-Konstrukte.

10 Abbildung 10 zeigt die Aminosäuresequenzen der intrazellulären Domänen der Genprodukte von SIVagm3 *env*-Konstrukten. Zum Vergleich sind die Sequenzen des SIVagm3 und des MLV angegeben. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Aminosäuren, die von MLV-Sequenzen abgeleitet wurden, sind unterstrichen. Die in den Namen der Konstrukte enthaltenden Zahlen beziehen sich auf die N-terminal verbliebenen Aminosäuren nach der
15 Transmembranregion und vor den mittels rekombinanter PCR inserierten Stopcodons. Durch die Insertion einer Not I-Restriktionsschnittstelle folgen allerdings je zwei oder drei Aminosäuren, welche nicht in der nativen Sequenz des SIVagm3 vorkommen. Die durch die inserierten Not I-Schnittstellen kodierten Aminosäuren sind fett gedruckt dargestellt. "....." steht für Aminosäuren des SIVagm3, die nicht im einzelnen aufgeführt sind. "*" kennzeichnet den C-Terminus der
20 Proteine. Die Länge der intrazellulären Domänen ist angegeben. "aa" bedeutet Aminosäuren. "TMR" bedeutet Transmembranregion. Die Bezeichnung "*MLV*" steht für die inserierten 3'-liegenden Sequenzen des MLV *env*-Gens. Die inserierten C-Termini des MLV beinhalten jeweils das sogenannte p2-Protein (bestehend aus 16 aa), welches intrazellulär durch Proteolyse abgespalten wird, bevor die Hüllproteine in die Virionen eingebaut werden.

25 Abbildung 11 ist eine graphische Darstellung der Effizienz der Bildung von MLV(SIVagm)-Vektoren nach Transfektion der *env*-Varianten in TELCeB6/*rev*-Zellen. Die T-Zellen wurden für zwei Tage im selben Medium und in Gegenwart der Transfektanden kokultiviert und anschließend mittels X-Gal-Test auf den erfolgten Gentransfer hin untersucht. Die angegebenen Werte stellen
30 Mittelwerte aus zwei Experimenten dar. "Mock" bezeichnet die Negativkontrolle.

Abbildung 12 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Titration der MLV(SIVagm)-Vektorstocks auf verschiedenen CD4⁺-Zelllinien.

Abbildung 13 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Inhibition der Transduktion von T-Zellen mittels Blockade des zellulären CD4-Rezeptors durch monoklonale anti-CD4 Antikörper. Die eingesetzten Konzentrationen des Antikörpers IOT4a sind in der Legende angegeben. Die erreichten Transduktionseffizienzen in Abwesenheit der Antikörper wurden als Referenz 100% gleichgesetzt und die Titer in Anwesenheit der Antikörper in Prozent dieser Positivkontrolle ausgedrückt.

Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet ein replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z.B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens übertragen kann.

Der hier verwendete Begriff "therapeutisches Gen" bedeutet eine Nukleinsäuresequenz, die in die Zielzelle mittels des retroviralen Vektors eingeführt werden soll und umfaßt komplette Gene, deren Fragmente, Antisense-Nukleinsäuren und dergleichen. Der hier verwendete Begriff SIV bedeutet Viren der Familie des Affen-Immunschwächevirus, z.B. *Cercopithecus aethiops* (SIVagm), *Macaca mulatta* (SIVmac), *Pan troglodydytes* (SIVcpz), *Cercopithecus mitis* (SIVsyk), *Papio sphinx* (SIVmnd), *Cercocebus atys* (SIVsm) oder *Macaca nemestrina* (SIVmne). Der hier verwendete Begriff SIVagm3 bezeichnet den Moleklarklon SIVagm3mc (Baier et al., *J. Virol.* 62 (1989), 4123-4128).

Die Herstellung von MLV(HIV-1)- und MLV(SIVagm3)-Vektoren der Erfindung wird nachfolgend näher erläutert.

Zunächst wird eine DNA-Sequenz hergestellt, welche die Bildung der notwendigen Proteine induziert, die zur Bildung von Viruskernen in der Lage sind. Die DNA-Sequenz wird in eine humane Wirtszelle transferiert und dort exprimiert. Die DNA-Sequenz enthält zusätzlich Operator-Elemente, die zur Expression der DNA-Sequenz erforderlich sind, welche die Bildung der Viruskern induzieren. In die so gewonnene Wirtszelle wird eine zweite DNA-Sequenz übertragen, die zur Bildung von Hüllproteinen führt, die nicht von dem Virus stammen, von welchem die Viruskern stammen. Danach wird eine weitere DNA-Sequenz eingebracht, die von den Viruskernen verpackt wird und Sequenzen enthält, die zur Bildung der therapeutischen Gensequenzen oder der gewünschten Proteine in der Zelle führen, in die mit Hilfe des retroviralen Vektors therapeutische Gene übertragen werden sollen.

Die DNA-Sequenz, welche zur Expression der Vektorhüllproteine führt, kann vorzugsweise vom *env*-Gen des HIV-1, HIV-2 oder anderer HIV-Stämme, des SIV, z.B. *Cercopithecus aethiops* (SIVagm), *Macaca mulatta* (SIVmac), *Pan troglodydytes* (SIVcpz), *Cercopithecus mitis* (SIVsyk), *Papio sphinx* (SIVmnd), *Cercocebus atys* (SIVsm) oder *Macaca nemestrina* (SIVmne) stammen. Die verwendeten *env*-Gene können der Originalversion der genannten Viren entsprechen oder verkürzte Formen dieser *env*-Gene oder sogar modifizierte Formen dieser *env*-Gene sein. Das besonders bevorzugte HIV-1 *env*-Gen-pTr712 führt zur Bildung eines Vollängen-Oberflächenproteins gp120-SU und eines verkürzten Transmembranproteins. Das ebenfalls besonders bevorzugte SIVagm3 *env*-Gen $\Delta 0env$ führt zur Bildung eines Vollängen-Oberflächenproteins gp130-SU und eines verkürzten Transmembranproteins. Das Transmembranprotein kann auch z. B. durch das Anhängen der C-terminalen Domäne oder eines beliebigen anderen Fragments des Transmembranproteins des MLV oder eines anderen Virus modifiziert sein. Beispielsweise kann bei Verwendung von MLV Kapsidpartikeln der C-Terminus des Transmembranproteins des MLV anstelle des C-Terminus des HIV-1 *env*-Gens oder SIVagm *env*-Gens verwendet werden. Dabei kann die Spaltstelle des C-terminalen p2 Peptids modifiziert sein oder nicht.

Die genannten erfindungsgemäßen viralen Vektoren können zur Übertragung von therapeutischen Genen in bestimmte Zelltypen verwendet werden. Beispielsweise übertragen die erfindungsgemäßen MLV(HIV-1)- und MLV(SIVagm3)-Vektoren Gene speziell in CD4-positive Zellen. Diese Vektoren besitzen somit den Tropismus des HIV-1 bzw. SIVagm3, deren Hüllproteine sie enthalten.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

Beispiel 1: Herstellung von MLV(HIV-1)-Vektoren

1.1 Zelllinien und Plasmide

Alle verwendeten Plasmide wurden aus transformierten *E. coli* der bekannten Stämme DH10 α oder HB101 präpariert. Die molekulare Klonierung der Expressionskonstrukte pL β Ac/*env*-neo ist von Kräusslich et al., *Virology* 192 (1993), 605-617 und pLssAc/*env*-Tr712-neo ist von Kräusslich et al., *Virology* 192 (1993), 605-617 und Wilk et al., *Virology* 189 (1992), 167-177

beschrieben. Diese Expressionskonstrukte kodieren die HIV-1 *env*-Gen-Varianten und das Neomycin-Resistenzgen. Das Expressionskonstrukt pCRUCA, welches das *env*-Gen des amphotropen MLV umfaßt, wurde von Wilk et al., *Virology* 189 (1992), 167-177 und Battini et al., *J. Virol.* 66 (1992), 1468-1475 beschrieben. Die TELCeB6 Verpackungszelllinie, die das retrovirale Expressionskonstrukt MFG-nlsLacZ sowie die Gene *gag* und *pol* des MLV exprimiert, wurde von Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436 beschrieben. Die HeLa-CD4⁺ Zellen wurden über das MRC AIDS Programm Reagents Project bezogen, die 293-Zellen wurden von ATCC (ATCC CRL 1573) bezogen. Alle adhärenenten Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) in Gegenwart von 10 % fetalem Kälberserum gehalten. Die humane T-Zelllinie Molt 4 (ATCC CRL 1582) wurde in RPMI-1640-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) propagiert. Die Transfektion der Verpackungszelllinie TELCeB6 mit dem Expressionskonstrukt pTr712 wurde mittels Lipofektamin (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Transfektion des Plasmids pREP4 (Invitrogen, Leek, Niederlande) wurde die Hygromycin-Selektion in Gegenwart von 200 mg /ml Hygromycin B (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt. Einer der daraus hervorgegangenen Klone stellt die Zelllinie TELCeB6/pTr712-K14 dar.

1.2 Virale Infektion, Bestimmung von Titern und Neutralisationsexperimente

Die adhärenenten Zellen wurden in 24-Well(Vertiefung)-Platten in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Well oder in 6-Well-Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well ausgesäht. Die Molt-4-Zellen wurden in 6-Well-Platten in einer Dichte von 8×10^5 ausgesäht. Vor der Infektion wurden die Zellen über Nacht in Zellmedium inkubiert. Zur Infektionen wurden die Zielzellen drei Stunden mit 1 ml verdünnten oder unverdünnten Retroviruspartikel-enthaltenden Überständen koinkubiert. Die Virionen enthaltenden Überstände wurden vorher durch einen 0,45 mm-Filter passagiert, um die kontaminierenden Zellen zu entfernen. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zielzellen mittels x-Gal-Test auf β -Gal-Expression untersucht. Die viralen Titer wurden wie beschrieben bestimmt. Die Titer sind in Kolonie bildenden Einheiten pro ml angegeben (*colony forming units*, cfu). Zur Neutralisation der pseudotypisierten Vektoren wurde Serum eines HIV-1 infizierten Spenders eingesetzt.

1.3 Immunanfärbung der Transfektanden

Die mit der DNA der Plasmide, welche die Hüllproteine des HIV-1 kodierten, transfizierten TELCeB6-Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit eiskaltem Methanol
5 inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde eine Stunde lang Blockierungspuffer (PBS/ 2 % BSA) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschliessend mit einer 1:1000 verdünnten anti-HIV-1 Serumlösung 1 Stunde inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit Peroxidase-gekoppeltem Protein G (Bio-Rad, Krefeld, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden die Antigen-präsentierenden Zellen durch Zugabe von
10 Substratpuffer (H_2O_2 mit 3-Amino-9-ethylcarbazol, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angefärbt. Es konnte gezeigt werden, daß das Plasmid pTr712 die Bildung der von HIV-1 abgeleiteten Hüllproteine in den Transfektanden erlaubte.

1.4 Western-Blot-Analyse

15 Die Herstellung der Zellysate und die Durchführung der Western-Blots erfolgte nach üblichen Verfahren. Die Viruspartikel in den Überständen der mit den von HIV-1 abgeleiteten Hüllproteinen kodierenden Plasmiden transfizierten Verpackungszellen wurden mittels Ultrazentrifugation (45 min bei 200.000 x g und 40°C) aufkonzentriert. Die Zentrifugate wurden
20 in Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse wurde unter der Verwendung eines Ziegenserums gegen HIV-1 gp120-SU und Peroxidase-gekoppeltem Protein G durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektionskit (Amersham, Braunschweig, Deutschland) nachgewiesen. Sowohl in den Zellysaten als auch in den Vektorpartikeln konnte das Oberflächen-Hüllprotein gp120-SU des
25 HIV-1 nachgewiesen werden.

1.5 Membranfusionseigenschaft des HIV-1-Hüllproteins

Eine subkonfluente Kultur der Verpackungszelllinie TELCeB6/pTr712-K14 wurde mit Jurkat-
30 Zellen überschichtet, 48 h propagiert und anschließend photographiert. Es wurde eine Reihe von Synzytien beobachtet, so daß die Funktionalität der von der obengenannten Zelllinie gebildeten Hüllproteine des HIV-1 gezeigt werden konnte.

Beispiel 2: Herstellung von MLV(SIVagm3) Vektoren

2.1 Klonierung der SIVagm3 env-Expressionskonstrukte

- 5 Zur Klonierung rekombinanter Varianten des *env*-Gens des SIVagm3 wurde das Plasmid pRep 4 (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet. Zur Herstellung der *env*-Varianten wurde zunächst die Sequenz zwischen den Basen 5713 und 8411 des SIVagm3 aus dem Plasmid pMB2 (Baier et al., *J. Virol.* 63 (1989), 5119-5123) mittels rekombinanter PCR (rPCR) unter Verwendung der Oligonukleotide Nhe AGM ENV+ (SEQ ID NO:1) und Xho AGM ENV- (SEQ ID NO:2)
- 10 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Nhe I und Xho I in den Vektor pRep4 inseriert. Die mittels rPCR hergestellte cDNA umfaßt beide *rev*-Exons und den gesamten Leserahmen des *env*-Gens. Das erhaltene Plasmid wurde pRep *wt env* genannt und diente im folgenden als Matrize für weitere rPCRs und als Vektor für weitere Klonierungen.
- 15 Zunächst wurden die verkürzten *env*-Gene $\Delta 0$ *env*, $\Delta 7$ *env* und $\Delta 16$ *env* kloniert. Dazu wurden zunächst die jeweiligen Oligonukleotide Not STOP 0-/ + (0-: SEQ ID NO:3, 0+: SEQ ID NO:4), Not STOP 7-/ + (7-: SEQ ID NO:5, 7+: SEQ ID NO:6) und Not STOP 16-/ + (16-: SEQ ID NO:7, 16+: SEQ ID NO:8), in PCRs eingesetzt, um das gewünschte Stop-Codon und eine 5' liegende Not I-Restriktionsschnittstelle zu inserieren. Als flankierende Oligonukleotide dienten jeweils die
- 20 Oligonukleotide SIV ENV HIII+ (SEQ ID NO:9) und Xho AGM ENV- (SEQ ID NO:2), um die Amplifikate möglichst klein und somit die Wahrscheinlichkeit der fehlerhaften Amplifikation durch die *Taq*-Polymerase gering zuhalten. Die in den einzelnen PCRs erhaltenen Amplifikate wurden in üblicher Weise isoliert und dann in Fusions-PCR eingesetzt (Amplifikat SEQ ID NO:9/3 mit Amplifikat SEQ ID NO:4/2; Amplifikat SEQ ID NO:9/5 mit Amplifikat SEQ ID
- 25 NO:6/2; Amplifikat SEQ ID NO:9/7 mit Amplifikat SEQ ID NO:8/2). Das erste Amplifikat enthält dabei die Sequenzen des SIVagm *env* von der Hind III-Schnittstelle (6817) bis zum -Primer (Not STOP 0- / 7- / 16-), welcher eine NOT I-Schnittstelle und das zu inserierende Stopcodon sowie die in der Matrize 3'-folgenden Sequenzen enthält. Das zweite Amplifikat beginnt 5' mit den +Primern (Not STOP 0+ / 7+ / 16+), welche die letzten 3'-liegenden Basen des
- 30 ersten Amplifikates, eine Not I-Schnittstelle und das Stopcodon enthält, und endet mit der Sequenz des Xho AGM ENV-Primers. Die in der Fusions-PCR jeweils eingesetzten Amplifikate besaßen somit überlappende Sequenzen, die eine Hybridisierung zuließen. Mittels Fusions-PCR wurden die aneinander hybridisierten Amplifikate unter Verwendung der Primer Xho AGM ENV-

und SIV ENV HIII+ amplifiziert. Die so erhaltenen Fusionsfragmente wurden nach Restriktion (Hind III / Xho I) in den Vektor Rep *wt env* (Hind III / Xho I) kloniert. Die *env*-Varianten $\Delta 0MLV env$ und $\Delta 7MLV env$ wurden aus den Varianten $\Delta 0env$ und $\Delta 7env$ hergestellt.. Hierzu wurden die 3'-liegenden Regionen des MLV *env*-Gens, welche die intrazellulären Anteile des

5 TM-Proteins p15 codieren, mittels rPCR unter Verwendung der Oligonukleotide MLV Not- (SEQ ID NO:10) und MLV Not 7+ (SEQ ID NO:11) bzw. MLV Not 0+ (SEQ ID NO:12) amplifiziert. Der molekular Klon pKA1558 wurde von Scov et al., *J. Gen. Virol.* 74 (1993), 707-714 beschrieben und diente hier als Matrize. Die Amplifikate wurden über die Restiktionsschnittstelle Not I in die *env*-Varianten $\Delta 0env$ und $\Delta 7env$ inseriert.

10

2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Abschitte wurde die Taq-DNA-Polymerase von Perkin-Elmer, Langen, Deutschland verwendet. Eine Standard-PCR (100 µl-Ansatz) enthielt: 1 x

15 PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine), 10 Amplifikat SEQ ID NO:9/7 mit Amplifikat SEQ ID NO:8/2µM je Oligodesoxynukleotid-Primer, 200 µM je Desoxynukleotid (dNTP), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und 100 ng Plasmid-DNA. Das PCR-Programm für die Primerpaare Amplifikat SEQ ID NO:9/3 mit Amplifikat SEQ ID NO:4/2, Amplifikat SEQ ID NO:9/5 mit Amplifikat SEQ ID NO:6/2 und Amplifikat SEQ ID

20 NO:9/7 mit Amplifikat SEQ ID NO:8/2 war wie folgt:

1. 94°C 300 sek
2. 94°C 45 sek
3. 55°C 120 sek
- 25 4. 72°C 180 + 2 sek
5. 10 Zyklen 2.-4.
6. 94°C 45 sek.
7. 60°C 120 sek.
8. 72°C 180 + 2 sek.
- 30 9. 10 Zyklen 6.-8.
10. 72°C 600 sek.

2.3 Zelllinien, Medien, Transformation und Transfektion

Plasmide wurden in die *E.coli*-Stämme DH5 α , DH10B, Top10F' (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) und GM 2163 (Invitrogen, Leek, Niederlande) auf übliche Weise eingebracht. Die Transfektion der Verpackungszelllinie TELCeB6, bzw. TELCeB6/*rev* mit den SIVagm *env*-Expressionskonstrukten wurde mittels Lipofektamin (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die TELCeB6 Verpackungszelllinie, die das retrovirale Expressionskonstrukt MFG-nlsLacZ sowie die *gag*- und *pol*-Gene des MLV exprimiert, wurde von Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436 beschrieben. In die Zelllinie TELCeB6/*rev* wurde ein Plasmid (pCMV-*rev*, NIH Research and Reference Reagent Program, Katalognummer 1443) durch stabile Transfektion eingebracht, welches die Expression des *rev*-Gens von HIV-1 unter der transkriptionellen Kontrolle eines CMV-Promotors erlaubte. Die Zelllinie TELCeB6/*rev* exprimiert somit zusätzlich das *rev*-Gen des HIV-1. Die Zelllinien TELCeB6 und TELCeB6/*rev* wurden in den nachstehend beschriebenen Medien für adhären- te Zellen unter Zugabe von Glucose (4 g/L) kultiviert. Adhären- te HeLa-CD4+ Zellen wurden über das MRC AIDS Programm Reagents Projekt, die HeLa-Zellen von ATCC (CCL 2) bezogen. Alle adhären- ten Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) in Gegenwart von 10 % Komplement-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom KG, Berlin, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin; Biochrom KG, Berlin, Deutschland) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf- atmosphäre in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Deutschland) kultiviert. Die Suspensionszellen C8166 (humane Leukämie-T-Zellen, die das defekte HTLV-1-Genom enthalten (NIH Research and Reference Reagent Program, Katalognummer 404), Jurkat-Zellen (humane Leukämie-T-Zellen; NIH Research and Reference Reagent Program, Katalognummer 177) und Molt 4.8-Zellen (humane Leukämie-T-Zellen; NIH Research and Reference Reagent Program, Katalognummer 175) wurden in RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin; Biochrom KG, Berlin, Deutschland) kultiviert.

2.4 Immunperoxidase-Antiperoxidase-Test (IPAP)

Um die korrekte Expression der *env*-Varianten zu überprüfen, wurden alle *env*-Konstrukte in TELCeB6-Zellen transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde mittels IPAP getestet, ob die Transfektanden die jeweilige *env*-Variante exprimierten. Die TELCeB6-Zellen wurden in 35 mm-Zellkulturschalen mit PBS gewaschen und mit -20°C kaltem Methanol 15 Minuten bei -20°C fixiert. Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf den erneut mit PBS gewaschenen Zellen mittels Blockierungspuffer (PBS + 2% BSA) eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem SIVagm-Antiserum (aus einem mit SIVagm in üblicher Weise infizierten Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*), das mit Blockierungspuffer verdünnt wurde, eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach weiteren Waschvorgängen mit PBS wurden die Fc-Anteile der Primär-Antikörper mittels Meerrettichperoxydase-konjugiertem Protein G (BIO-RAD, München, Deutschland) nach einstündiger Inkubation bei 37°C detektiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS erfolgte die Zugabe der Substratlösung (4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol in 1 ml Dimethylformamid gelöst, 19 ml 20 mM NaOAc-Puffer, pH 5 und 30 µl H₂O₂; durch einen 45 µm Filter filtriert). Nach wenigen Minuten Inkubation bei RT wiesen die Virusprotein exprimierenden Zellen eine deutliche Rotfärbung auf. Bis auf die Plasmide pRep $\Delta 7env$ und pRep $\Delta 7MLVenv$ erlaubten alle Konstrukte die Expression der Hüllproteine des SIVagm3. Bei der Analyse der Sequenzierungsdaten wurde festgestellt, daß die beiden Varianten pRep $\Delta 7env$ und pRep $\Delta 7MLVenv$ ein Stopcodon im zweiten *rev*-Exon aufwiesen, welches durch die Insertion der Not I-Schnittstelle entstanden war. Das so unvollständig gebildete Rev-Protein war offensichtlich nicht in der Lage, den Transport der mRNA-Transkripte der *env*-Gene aus dem Zellkern zu gewährleisten.

2.5 Synzytieninduktion

Da die Analyse mittels IPAP nur die gebildeten viralen Hüllproteine nachweist, mußten diese auch auf ihre Funktionalität überprüft werden. Mittels Synzytieninduktion sollte gezeigt werden, daß die Hüllproteine auf der Zellmembran präsentiert werden und Synzytien in CD4⁺-Zellen induzieren können. Dazu wurden die SIVagm *env*-Konstrukte in TELCeB6/*rev*-Zellen transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Transfektanden mit Zellen der T-Zelllinie Molt4.8 überschichtet und 24 h später fotografiert. Die auf der Zellmembran der Verpackungszellen präsentierten SIVagm-Hüllproteine sind in der Lage, die ebenfalls membranständigen CD4-Proteine der T-Zellen zu

binden. So kommt es zur Verschmelzung der beiden Zelltypen. Diese Synzytien unterscheiden sich durch ihre Größe von den Parentalzellen. Alle getesteten *env*-Varianten induzierten Synzytien in diesem Test, jedoch war das Ausmaß der Synzytieninduktion sehr verschieden. Die Varianten $\Delta 0env$ und $\Delta 16env$ induzierten große Synzytien, während die anderen Varianten einschließlich des *wt env* nur schwache Synzytieninduktion erzeugten. Jedoch konnte für alle Varianten gezeigt werden, daß ihre Expression zur Bildung membranständiger Proteine führte, welche in der Lage waren, CD4 zu binden.

2.6 Nachweis von β -Galactosidase-Aktivität (X-Gal-Test)

Mittels des X-Gal-Tests wurde eine erfolgreiche Transduktion humaner Zellen mit den MLV(SIVagm)-abgeleiteten Vektoren anhand des erfolgreichen Transfers des verpackbaren Konstruktes MFGlnsLacZ nachgewiesen. Der Nachweis der β -Galactosidase-Aktivität in transduzierten Zellen wurde nach einer modifizierten Methode (Sanes *et al.*, *EMBO J.* 5 (1986), 3133-3142) mittels X-Gal-Färbung erbracht. Neben dem β -Galactosidase-Substrat (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) [1mg/ml] enthielt der Reaktionsansatz 5 mM Kaliumferricyanid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 5 mM Kaliumferrocyanid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 2 mM $MgCl_2$ in PBS. Die mit PBS gewaschen Zellen wurden mit PBS, 2% Formaldehyd und 0,2% Glutardialdehyd 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem X-Gal-Reaktionsansatz 5 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anhand der intrazellulären Blaufärbung konnte die β -Galactosidase nachgewiesen werden.

2.7 Transduktion von T-Zellen mit MLV(SIVagm3)-Vektoren

4×10^5 TELCeB6/*rev*-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm ausgesät und 24 Stunden später mit den SIVagm *env*-Konstrukten transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Medien der Transfektanden erneuert. Sodann wurden Kokultivierungsgefäße (Costar, Cambridge, USA) in die Kulturschalen der Verpackungszellen eingesetzt, welche den freien Austausch von Medien und den darin enthaltenden Vektoren erlauben, den direkten Zell-Zellkontakt aber unterbinden. In diese Einsätze wurden je 10^6 T-Zellen der Linie Molt4.8 ausgesät und zusammen mit den Transfektanden zwei Tage kultiviert.

Anschließend wurden die T-Zellen zwei weitere Tage expandiert und abschließend mittels X-Gal-Test auf die Expression des Reportergens *lacZ* untersucht.

Die Transfektion aller SIVagm *env*-Varianten, deren intrazelluläre Domäne nicht länger als 19 Aminosäuren ist, führten zur Bildung von pseudotypisierten MLV-Vektoren, welche die T-Zellen erfolgreich transduzierten. Die Varianten *wt env* und $\Delta 36env$ erzeugten keine meßbaren Mengen dieser Vektoren. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pHIT456 (Soneoka et al., *Nucl. Acid. Research* 23 (1995), 628-633) transfiziert, welches das *env*-Gen des amphotropen MLV kodiert.

10 Beispiel 3:

3.1 Etablierung stabil transfizierter Verpackungszellklone

Zur Herstellung hochtitriger Vektor-Stocks wurden TELCeB6-Zellen mit den entsprechenden *env*-Konstrukten stabil transfiziert und anschließend selektioniert. Die Selektionsmedien entsprachen den zur Kultivierung benutzten Medien, enthielten aber zusätzlich das Neomycin-Analogon G418 (800 µg/ml) zur Selektion von *neo*⁺-Zellen (HIV-1 *env*-Konstrukte) oder Hygromycin B (200 µg/ml) zur Selektion von *hyg*⁺-Zellen (SIVagm *env*-Konstrukte). Die Antibiotika wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die Selektion transfizierter Zellen begann zwei Tage nach Transfektion und wurde etwa zehn Tage fortgeführt, bis sich Zellkolonien von Einzelzellklonen gebildet hatten. Die klonalen Zellen wurden mit einer Eppendorfpipette von der Kulturschale abgelöst und resuspendiert. Diese Einzelzellklone wurden zunächst in 24-Well-Platten expandiert und auf die Bildung von Vektoren mittels Titration auf geeigneten Zielzellen untersucht.

3.2 Erzeugung von pseudotypisierten MLV-Vektoren

Die von den Verpackungszellen produzierten Vektoren wurden wie folgt präpariert: Die Medien konfluenter Verpackungszellkulturen in großen Zellkulturflaschen (800 ml) wurden abgenommen. Die Zellen wurden mit 15 ml frischen Medium beschichtet und übernacht kultiviert. Anschließend wurden die Überstände "zellfrei" durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter filtriert und entweder direkt zur Transduktion eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3 Bestimmung der Vektortiter

Zur Bestimmung der Vektormengen in Überständen der Verpackungszellen wurden diese in verschiedenen Verdünnungen mit frischem Kulturmedium in einem Gesamtvolumen von 1 ml zur Transduktion permissiver Zielzellen (Molt4.8, C8166, Jurkat, HeLaCD4⁺) eingesetzt. Die gewählten Verdünnungen waren 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000. Die adhärenenten Zielzellen HeLa CD4⁺ wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Zellkulturschale (35 mm Durchmesser) einen Tag vor Transduktionsbeginn ausgesät. Vor Zugabe der vektorhaltigen Medien wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zwei Stunden bei 37°C in Gegenwart der Vektoren inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt, die Zellen erneut gewaschen und anschließend zwei weitere Tage expandiert, bevor die transduzierten Zellen mittels X-Gal-Test gefärbt wurden. Suspensionszellen wurden einen Tag vor Transduktionsbeginn mit frischen Medien versorgt. Zur Transduktion wurden je 10^6 Zellen in üblicher Weise pelletiert (abzentrifugiert) und direkt in den vektorhaltigen Verdünnungen resuspendiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen gewaschen und nach zweitägiger Expansion ebenfalls mittels X-Gal-Test auf den erfolgten Gentransfer untersucht. Die so gefärbten, *LacZ*⁺-Zellen wurden unter Verwendung eines Lichtmikroskopes (Axiovert 35, Carl Zeiss, Jena) in 10 bis 20 Gesichtsfelder gezählt und auf die Gesamtfläche der Kulturschale hochgerechnet. Die Verdünnung der vektorhaltigen Überstände wurde berücksichtigt und der Titer in cfu/ml angegeben. Molt4.8-Zellen erlaubten die besten Transduktionseffizienzen, wogegen die T-Zelllinien Jurkat und C8166 wesentlich schlechter zu transduzieren waren. Die HeLaCD4⁺-Zellen scheinen kaum permissiv für die MLV(SIVagm)-Vektoren zu sein. Die MLV(HIV-1)-Vektoren waren dagegen in der Lage, alle getesteten CD4⁺ Zelllinien effizient zu transduzieren.

Beispiel 4:

Nachweis der CD4-abhängigen Transduktion mittels MLV(SIVagm)-Vektoren

Die T-Zelllinie Molt4.8 wurde 30 min vor Zugabe der MLV(SIVagm3) Vektoren in Medien gehalten, die verschiedenen Konzentrationen (0 µg/ml, 0,625 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml) des CD4-bindenden monoklonalen Antikörpers IOT4a (Firma dianova, Hamburg) enthielten. Der Antikörper inhibiert den Eintritt verschiedener HIV- und SIV-Isolate durch die Blockade des zellulären Rezeptors CD4; vgl. Sattentau et al., *Science* 234 (1986), 1120-1127. Die T-Zellen wurden anschließend mittels der MLV(SIVagm)-Vektoren in Gegenwart der

vorstehend genannten Konzentrationen des anti-CD4-Antikörpers IOT4a transduziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und zwei Tage später mittels X-Gal-Test auf den erfolgten Gentransfer untersucht. Als Positivkontrolle wurden Zielzellen in Abwesenheit der Antikörper transduziert und als Referenz (100%) gewählt. Es zeigte sich eine eindeutig
5 konzentrationsabhängige Korrelation der Effizienz des Gentransfers mit der eingesetzten Menge der Antikörper.

SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

5 NAME: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den
Präsidenten des Paul Ehrlich Instituts
STRASSE: Paul Ehrlich Str. 51-59
ORT: Langen
10 LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 63225

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

15 Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre
Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive Zellen

ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

20 DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM PC-kompatibel
BETRIEBSSYSTEM: Windows 3.11
SOFTWARE: PATENTIN Ausgabe #1.0, Version #1.25

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

25 SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 25 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
30 TOPOLOGIE: linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:1:

35 CTAGCTAGCA TGCCCTAGG ATCAGAAGAA AGAAG 25

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

40 SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 23 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

45 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:2:

CCGCTCGAGC TAATTAAGGA TTCCTTCAAG GCC 23

50 ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 30 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
55 TOPOLOGIE: linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:3:

60 CAAGGCTGAG ACAAGCTTGG TGTCACCTCC 30

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:4:

65 SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 48 Basenpaare
ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

5 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:4:

GTTAGGCAGG GTTACGCGGC CGCTTAACCA CAGATCCATA TCCACCCG

48

10 ANGABEN ZU SEQ ID-NO:5:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 50 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

15 TOPOLOGIE: linear

MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:5:

20 CGGGTGGATA TGGATCTGTG GTTAAGCGGC CGCCTAACCC TGCCTAACCC

50

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:6:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

25 LÄNGE: 48 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

30 MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:6:

TACTCTCCTC TTTCTCGCGG CCGCTAAATC CACCCGTGGA AGGGACAG

48

35

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 53 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

40 STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:7:

45

TCCCTTCCAC GGGTGGATTT AGCGGCCGCG AGAAAGAGGA GAGTAACCCT GCC

53

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:8:

50 SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 41 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

55 MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:8:

ATCCACCCGT GGAAGGGCGG CCGCTAAAAC GCAGAAGGGC C

41

60

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:9:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 43 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

65

TOPOLOGIE:linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:9:

5 CCCTTCTGCG TTTTAGCGGC CGCCCTTCCA CGGGTGGATA TGG 43

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:10:

10 SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 56 Basenpaare
ART:Nucleinsäure
STRANGFORM:Einzelstrang
TOPOLOGIE:linear

15 MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:10:

20 AAAAGGAAAA GCGGCCGCTC GATTAGTCCA ATTTGTTAAA GACAGGATAT CAGTGG 56

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:11:

25 SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 51 Basenpaare
ART:Nucleinsäure
STRANGFORM:Einzelstrang
TOPOLOGIE:linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

30 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:11:

AAAAGGAAAA GCGGCCGCGA CAGGATATCA GTGGTCCAGG CTCTAGTTTT G 51

35 ANGABEN ZU SEQ ID-NO:12:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 49 Basenpaare
ART:Nucleinsäure
STRANGFORM:Einzelstrang
40 TOPOLOGIE:linear
MOLEKÜLTYP: synthetisches Oligonucleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:12:

45 AAAAGGAAAA GCGGCCGCCT ATGGCTCGTA CTCTATAGGC TTCAGCTGG 49

Patentansprüche

- 5 1) Retrovirale Vektoren umfassend Viruskern und aus Oberflächenhüllproteinen und transmembranen Hüllproteinen bestehende Virushüllen, wobei die Viruskern vom murinen Leukämievirus (MLV) und die Virushüllen von menschlichen Immunschwächeviren (HIV) oder Affen-Immunschwächeviren (SIV) stammen.
- 10 2) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1, wobei die Virushüllen vom menschlichen Immunschwächevirus 1 oder 2 (HIV-1 bzw. HIV-2) oder Affen-Immunschwächevirus *Cercopithecus aethiops* (SIVagm) oder *Macaca mulatta* (SIVmac) oder *Pan troglodytes* (SIVcpz) oder *Cercopithecus mitis* (SIVsyk) oder *Papio sphinx* (SIVmnd) oder *Cercocebus atys* (SIVsm) oder *Macaca nemestrina* (SIVmne) stammen.
- 15 3) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine nicht verkürzte oder verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten.
- 20 4) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten.
- 25 5) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 4, wobei die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten, das durch den C-Terminus oder ein beliebiges Fragment des transmembranen Proteins des murinen Leukämievirus (MLV) oder eines anderen Retrovirus verlängert worden ist.
- 30 6) Verfahren zur Herstellung von Verpackungszellen, die retrovirale Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 bilden, umfassend das Transfizieren einer Verpackungszelle (*gag*-, *pol*- und Expressionskonstrukt-positiv), die vom MLV stammende Hüllproteine produziert oder nicht produziert (*env*-negativ), mit einem Expressionsgen, das die genetische Information für Hüllproteine enthält (*env*-positiv).
- 7) Verfahren zur Herstellung von Verpackungszellen, die retrovirale Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 bilden, umfassend das Transfizieren einer Zelle mit

Expressionsgenen für *gag* und *pol*, und/oder einem Expressionskonstrukt, umfassend ein Verpackungssignal und die zu überführende genetische Information, und einem Expressionsgen, das die genetische Information für Hüllproteine enthält.

- 5 8) Verfahren nach Anspruch 6, wobei als MLV-*env*-negative Verpackungszelle die Zelllinie TELCeB6 verwendet wird.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei als *env*-Expressionsgen pL β Ac/*env*-Tr712-neo oder pRep Δ 16 *env*, pRep Δ 7 *env*, pRep Δ 0 *env*, pRep Δ 7MLV *env* oder pRep Δ 0MLV *env* verwendet wird.
- 10
- 10) Verpackungszellen, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9.
- 11) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als
- 15 medizinisches Arbeitsmittel (Arzneimittel).
- 12) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Überführung von Genen in CD4-positive Zellen von Säugern.
- 20 13) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Überführung von Genen in CD4-positive Zellen des Menschen.
- 14) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Arzneimittels zur gentechnischen Modifizierung von CD4-positiven Zellen oder zur
- 25 Bereitstellung eines Wirkstoffs im Rahmen der Gentherapie.

Gentherapie mit retroviralen Genfähren

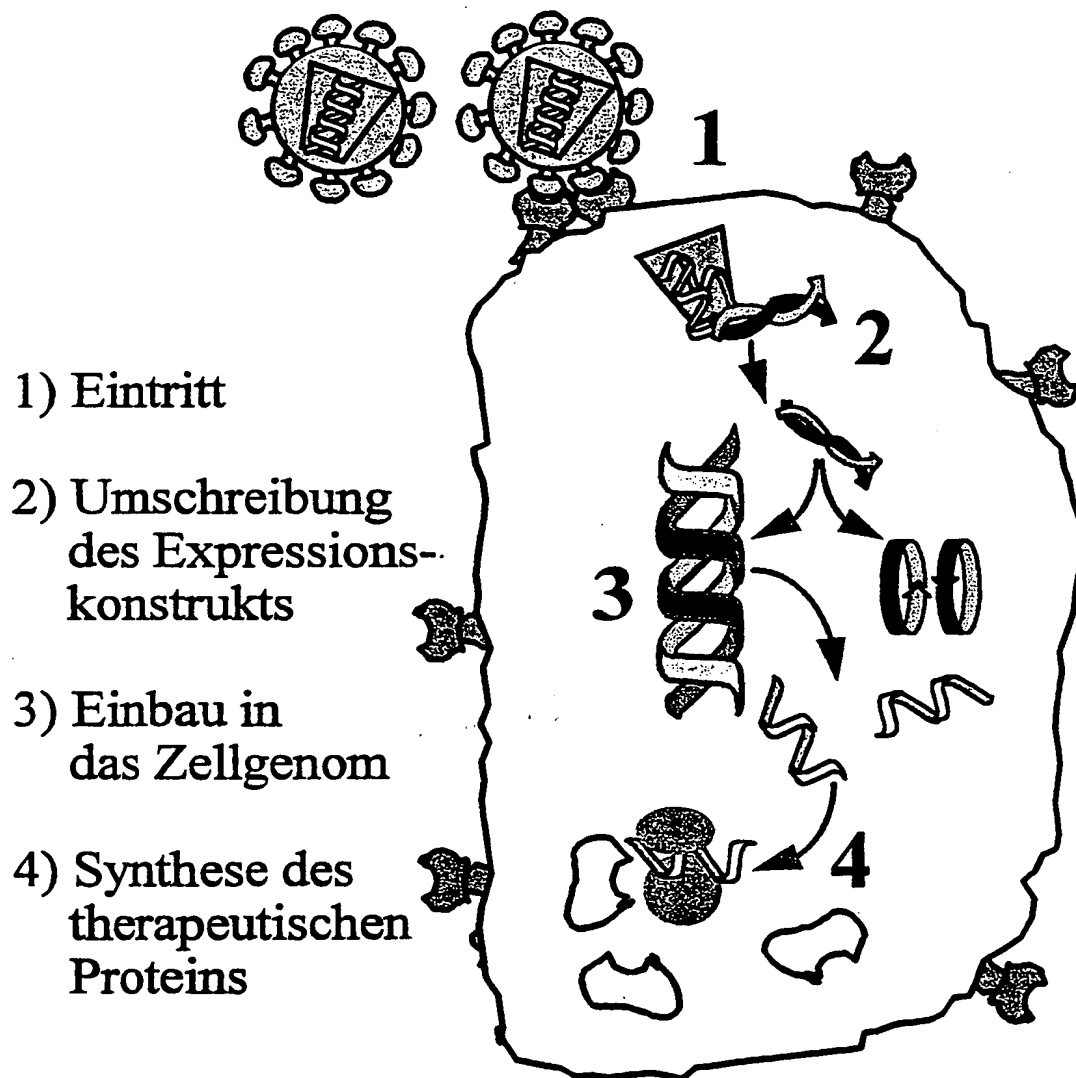


Abb. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

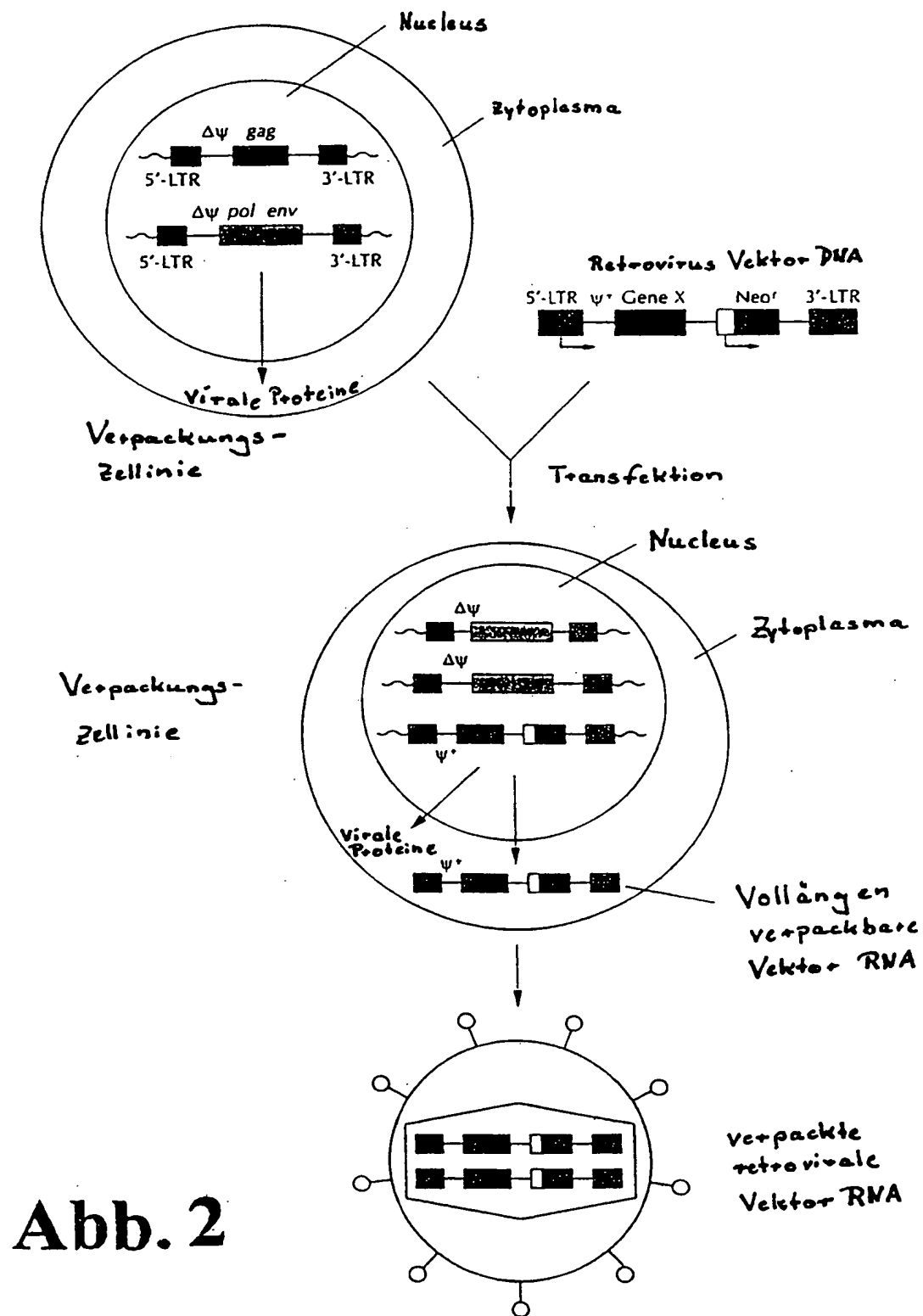


Abb. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Erzeugung retroviralen Vektoren

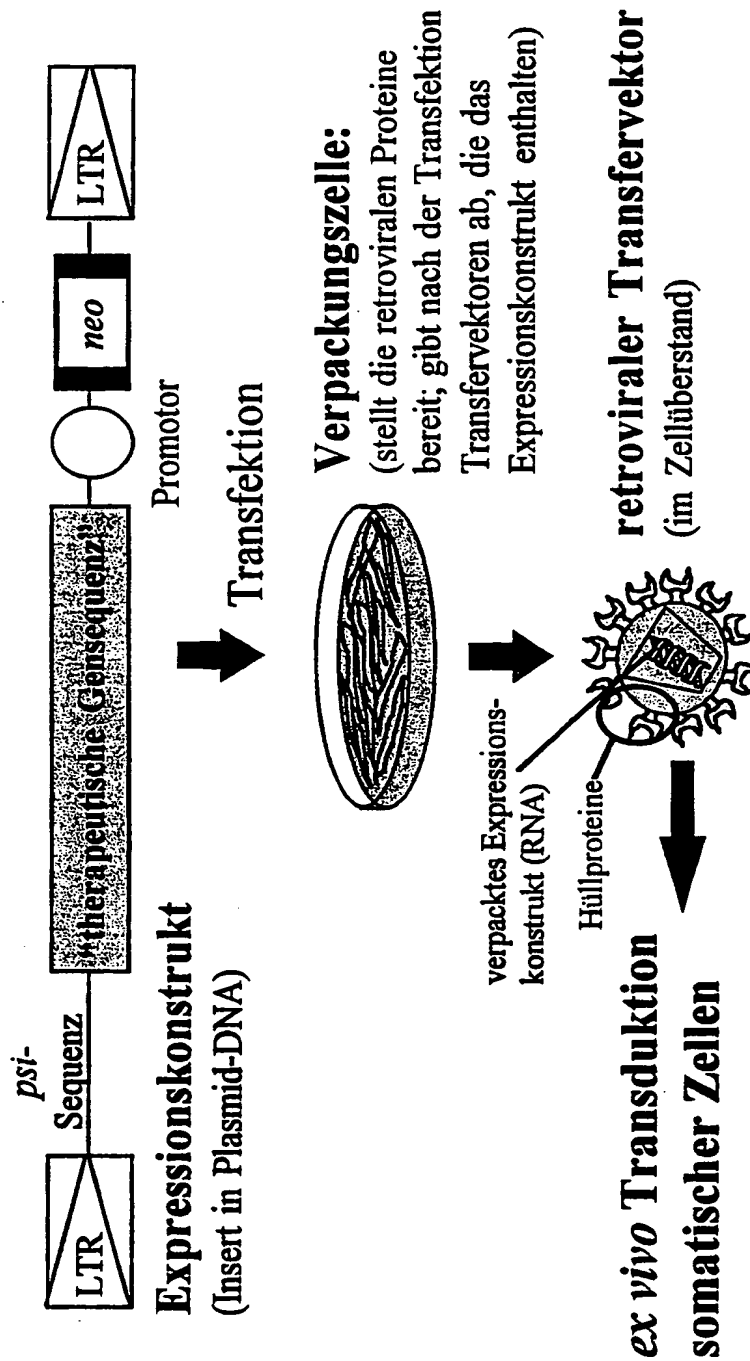


Abb. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Retrovirale Verpackungszelle

z. B. TE671-Zellen: humane Mellularblastom-Zellen

+

Expressionsgene für *gag* und *pol* des MLV,
die nicht verpackt werden



Blasticidin-
Resistenzgen

+

pMFGlnsLacZ:

Exprtessionskonstrukt für *lacZ*,
das verpackt wird



+

env-Genvariante des HIV-1,
die ein verkürztes Transmembran
exprimiert

N- gp120-SU Δgp41-TM -C



Fusions- Membran
peptid -region



Stopkodon statt Aminosäure 712

Abb. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Aufbau retroviraler Vektoren mit Fremd-Hüllproteinen des HIV-1

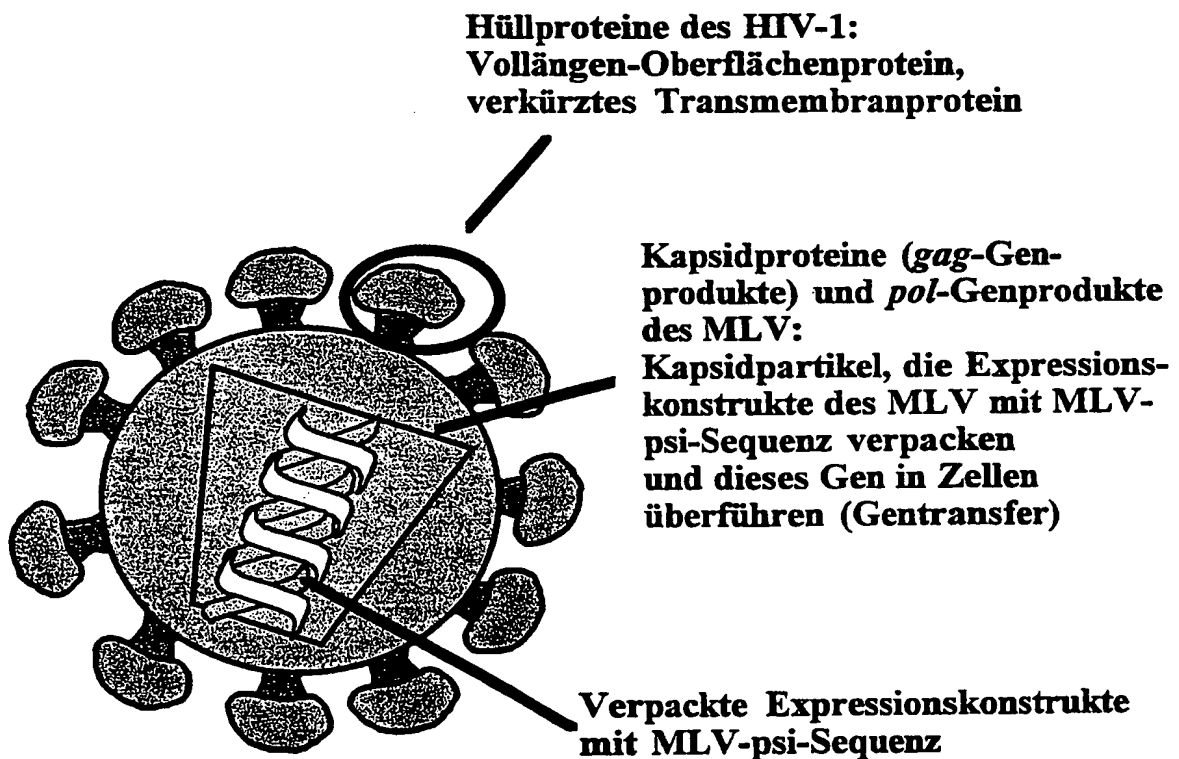


Abb. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

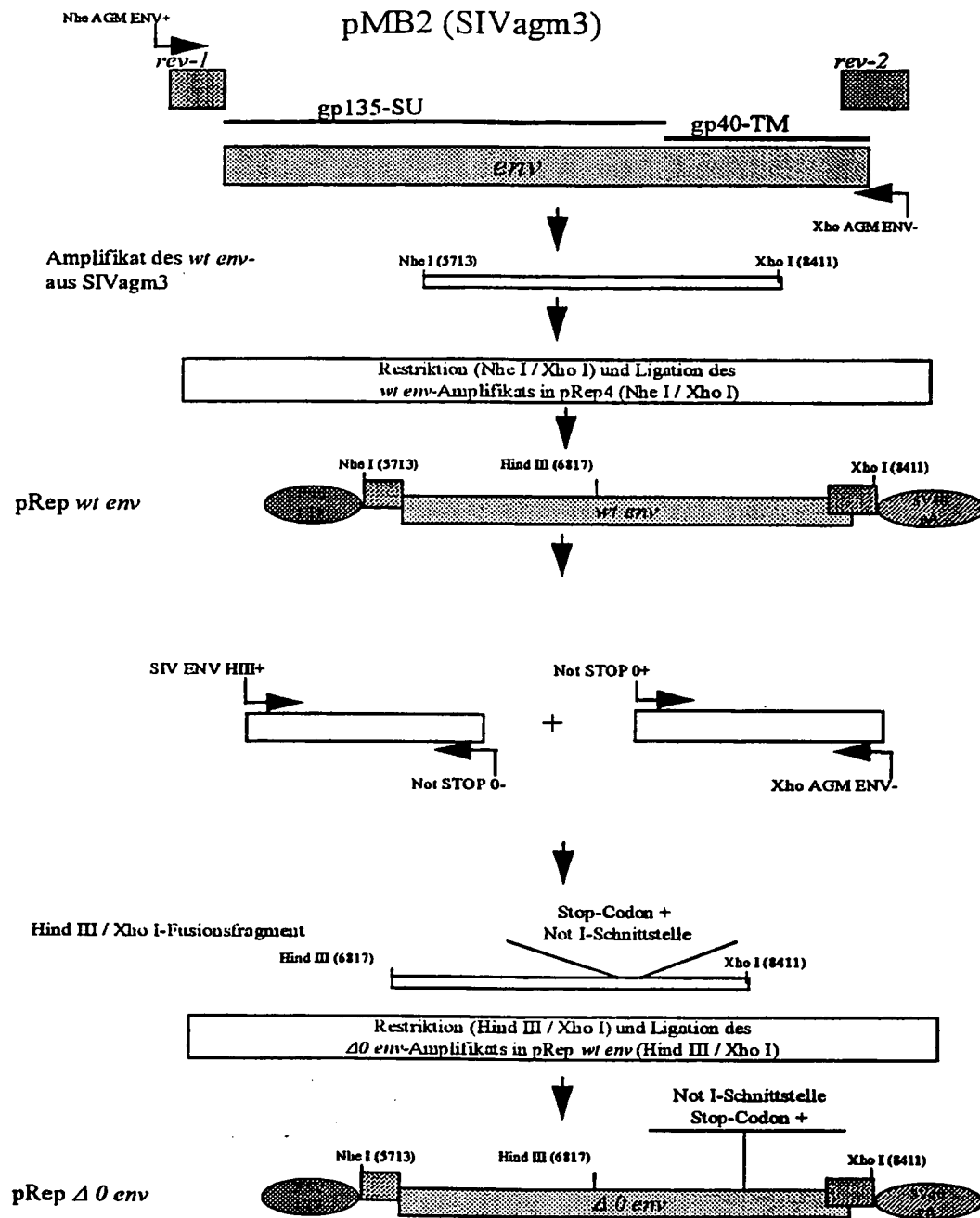


Abb. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

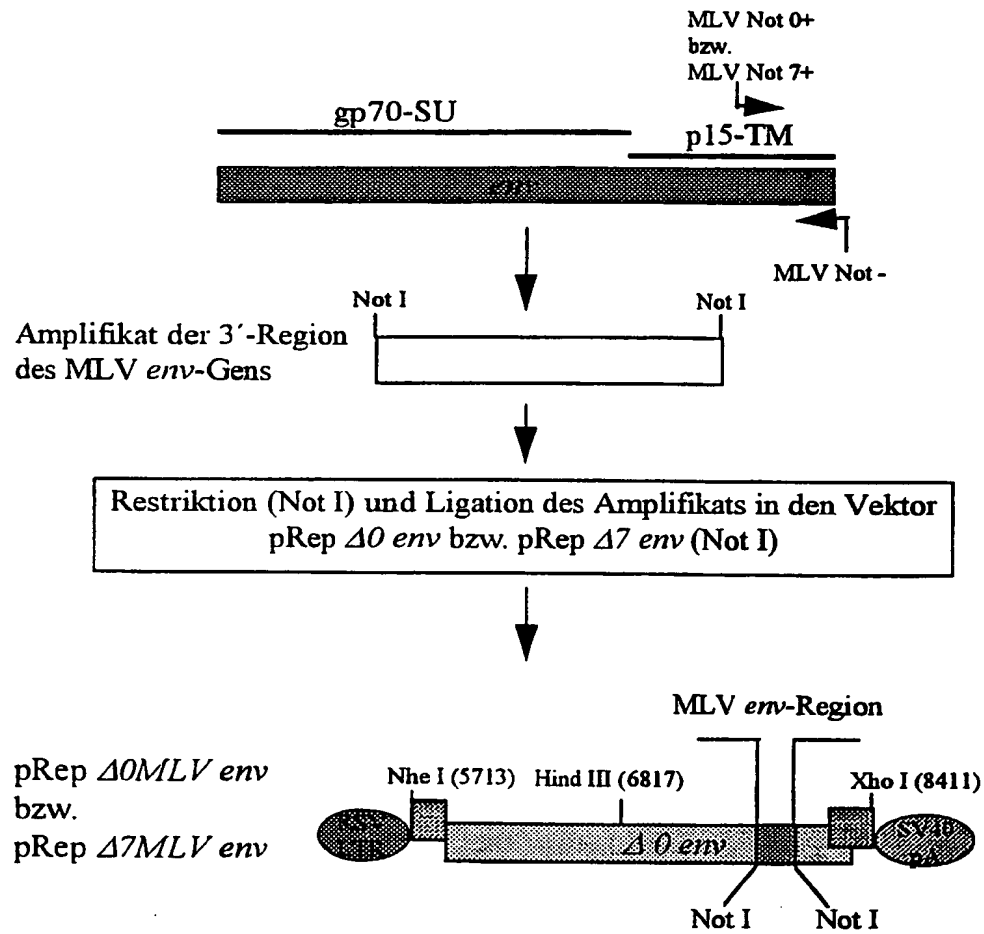
MLV *env* aus pKA1558

Abb. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Nhe AGM ENV+: **Nhe I**

5'-CTAGCTAGCATGCCCTAGGATCAGAAGAAAGAAG-3'

Xho AGM ENV-: **Xho I**

5'-CCGCTCGAGCTAATTAAGGATTCCTTCAAGGCC-3'

SIV ENV HIII+: **Hind III**

5'-CAAGGCTGAGACAAGCTTGGTGTCACTTCC-3'

Not STOP 0+: **Not I**

5'-GTTAGGCAGGGTTACGCGGCCGCTTAACCACAGATCCATATCCACCCG-3'

Not STOP 0-: **Not I**

5'-CGGGTGGATATGGATCTGTGGTTAAGCGGCCGCTAACCCTGCCTAACCC-3'

Not STOP 7+: **Not I**

5'-TACTCTCCTCTTTCTCGCGGCCGCTAAATCCACCCGTGGAAGGGACAG-3'

Not STOP 7-: **Not I**

5'-TCCCTTCCACGGGTGGATTTAGCGGCCGCGAGAAAGAGGAGAGTAACCCTGCC-3'

Not STOP 16+: **Not I**

5'-ATCCACCCGTGGAAGGGCGGCCGCTAAAACGCAGAAGGGCC-3'

Not STOP 16-: **Not I**

5'-CCCTTCTGCGTTTTAGCGGCCGCCCTTCCACGGGTGGATATGG-3'

MLV Not 0+: **Not I**

5'-AAAAGGAAAAGCGGCCGCTCGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGG-3'

MLV Not 7+: **Not I**

5'-AAAAGGAAAAGCGGCCGCGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTG-3'

MLV Not -: **Not I**

5'-AAAAGGAAAAGCGGCCGCTATGGCTCGTACTCTATAGGCTTCAGCTGG-3'

Abb. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

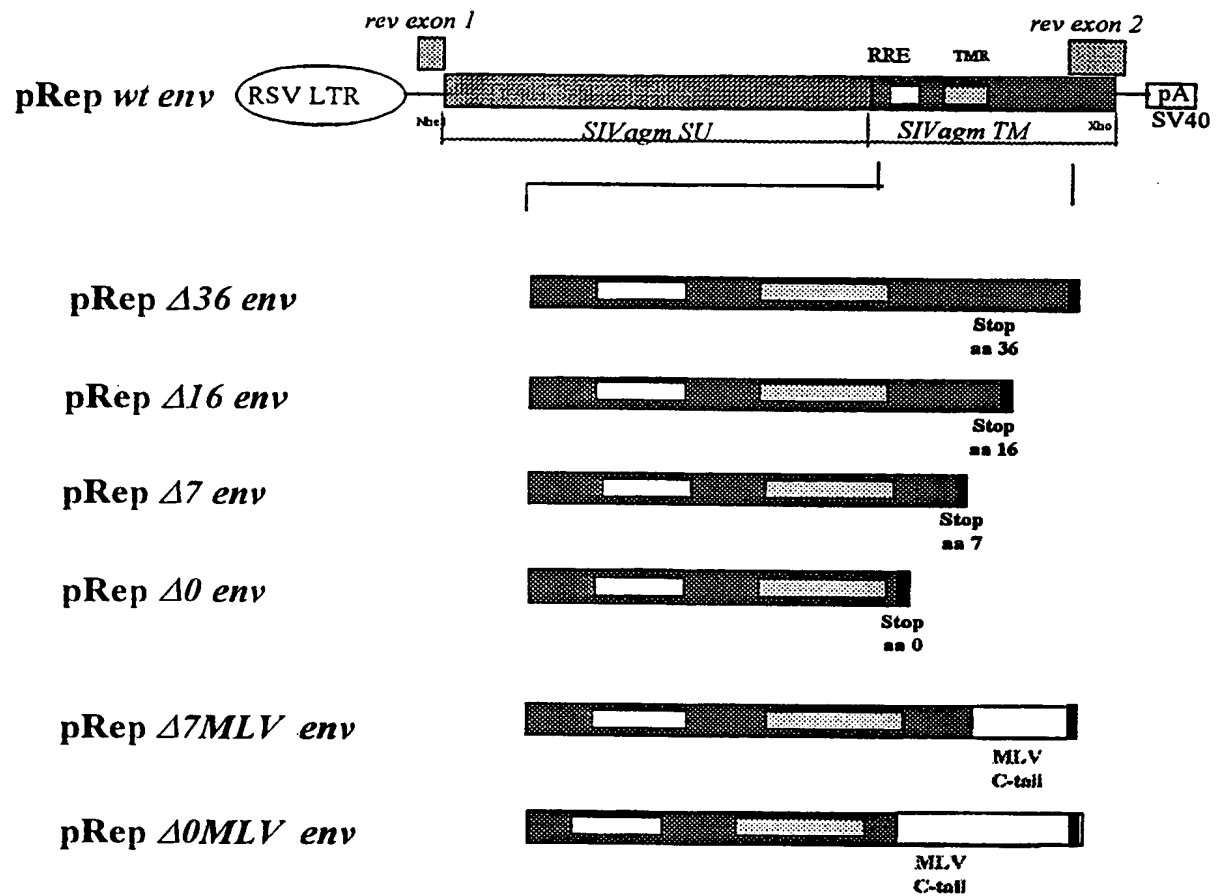


Abb. 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

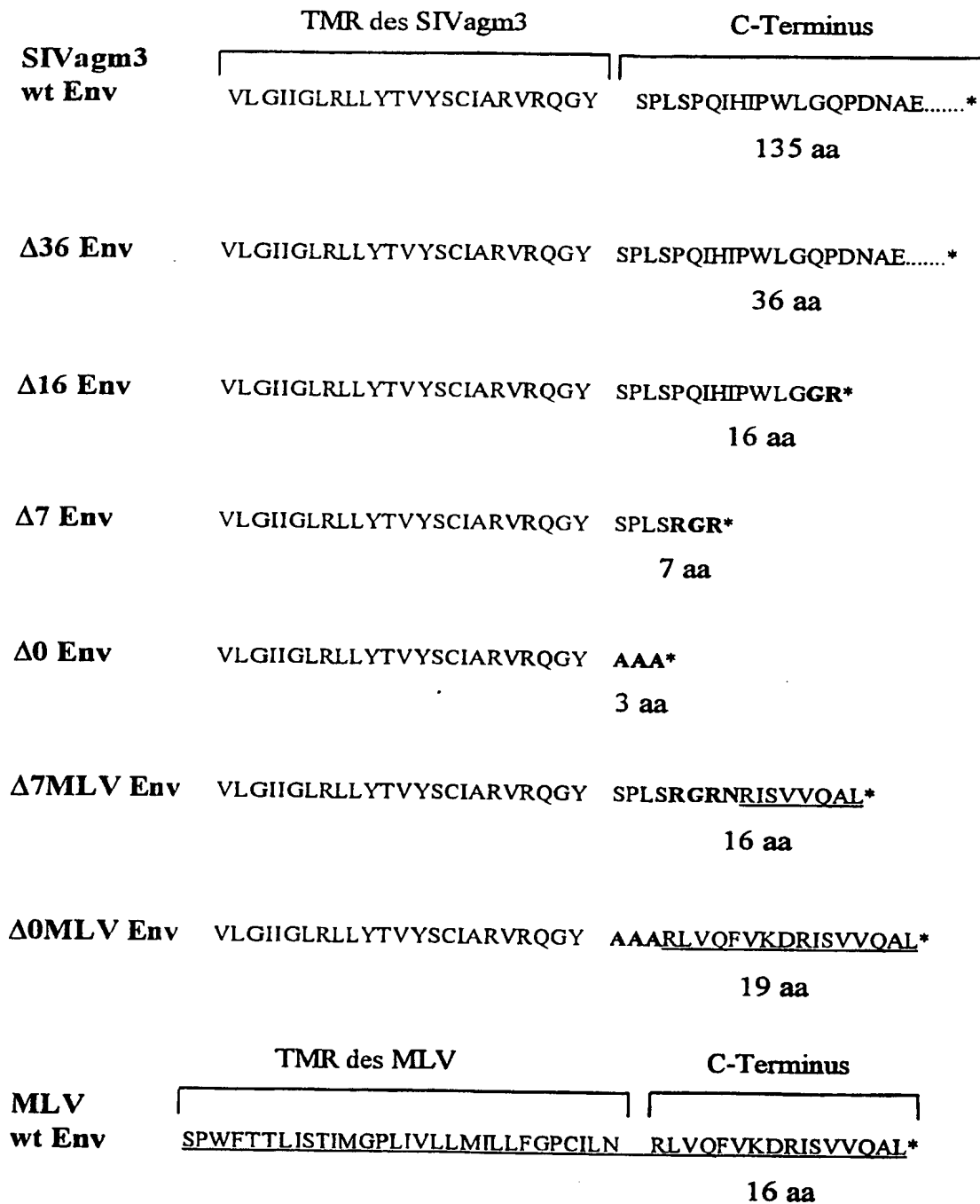


Abb. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

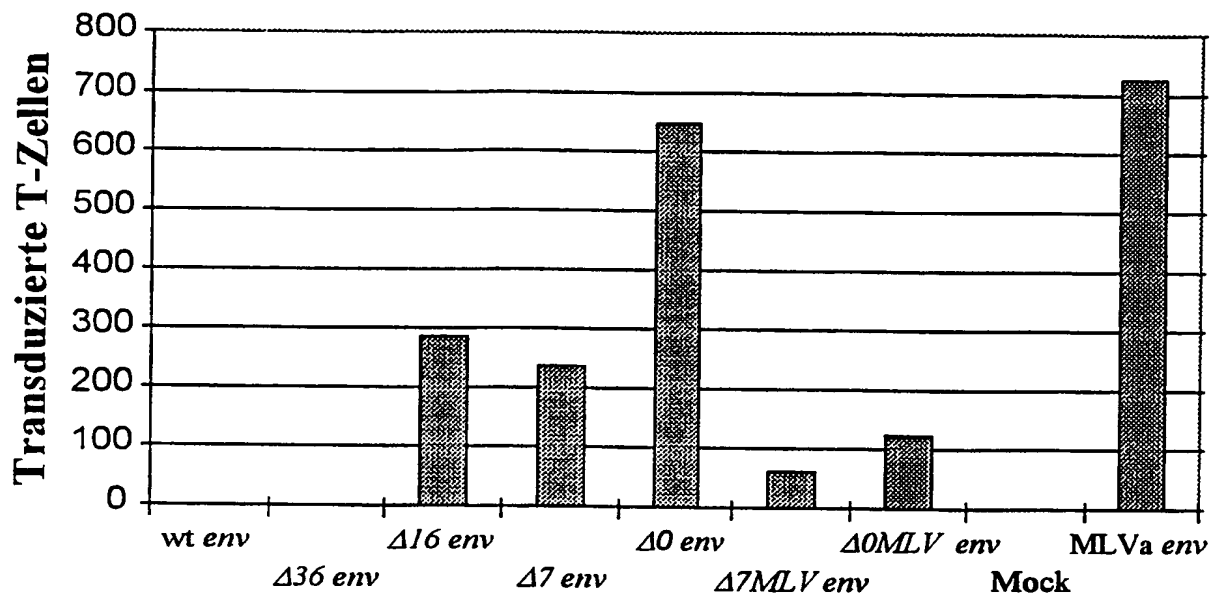


Abb. 11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

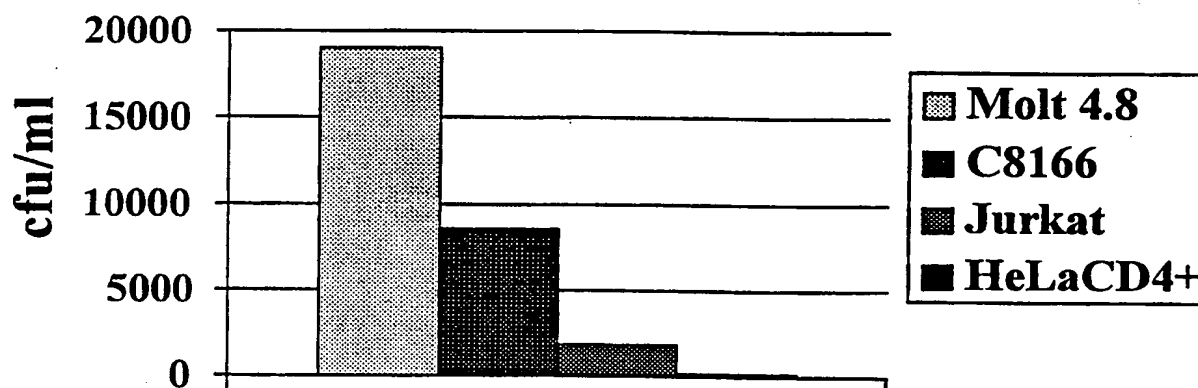


Abb. 12

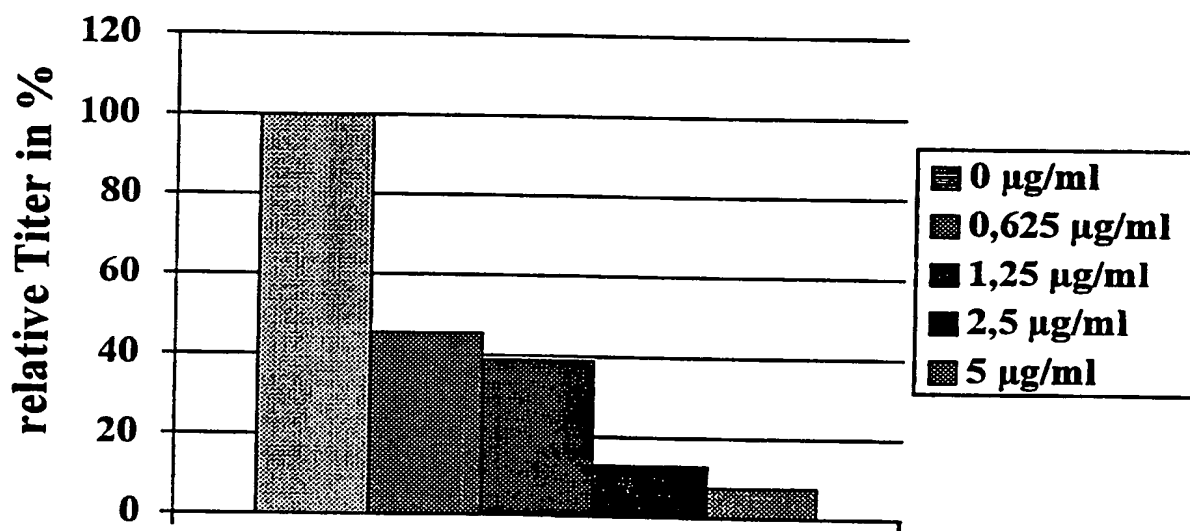


Abb. 13

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/38325 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. September 1998 (03.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/00593 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 1998 (27.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 07 971.7 27. Februar 1997 (27.02.97) DE 198 08 438.2 27. Februar 1998 (27.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND, letztvertreten durch den PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRlich-INSTITUTS [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D-63225 Langen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus [DE/DE]; Großer Hasenpfad 114, D-60598 Frankfurt am Main (DE). STITZ, Jörn [DE/DE]; Weberstrasse 25, D-60318 Frankfurt am Main (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 10. Dezember 1998 (10.12.98)
(54) Title: RETROVIRAL VECTORS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND THE USE THEREOF FOR GENE TRANSFER IN CD4-POSITIVE CELLS (54) Bezeichnung: RETROVIRALE VEKTOREN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG ZUR GENÜBERTRAGUNG IN CD4-POSITIVE ZELLEN (57) Abstract The invention relates to the production and use of retroviral vectors for cell-type specific gene transfer, specially to a production method of retroviral vectors containing capsid particles of murine leukemia virus (MLV) and envelope proteins of human immunodeficiency viruses (HIV) or simian immunodeficiency viruses (SIV). Said vectors can be used for gene transfer in selected cell types, specially in CD4-positive mammal cells. (57) Zusammenfassung Beschrieben ist die Herstellung und Verwendung retroviraler Vektoren für zelltypspezifischen Gentransfer, insbesondere ein Herstellungsverfahren von retroviralen Vektoren, die Kapsidpartikel des murinen Leukämievirus (MLV) und Hüllproteine humaner Immunschwäheviren (HIV) oder Affen-Immunschwäheviren (SIV) enthalten. Diese Vektoren können für die Genübertragung in ausgewählte Zelltypen, speziell in CD4-positive Säugerzellen verwendet werden.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/00593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SALMONS B. ET AL.: "CONSTRUCTION OF RETROVIRAL VECTORS FOR TARGETED DELIVERY AND EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES" LEUKEMIA, vol. 9, no. SUPPL. 01, 1 October 1995, pages S53-S60, XP000575934	1-3, 6, 7, 10-14
Y	see page S55, right-hand column, last paragraph - page S56, left-hand column, paragraph 1 see page S58, left-hand column, paragraph 3 --- -/--	4, 8, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 August 1998

Date of mailing of the international search report

24/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/00593

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WILK T. ET AL.: "Retained in vitro activity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product." VIROLOGY, vol. 189, 1992, pages 167-177, XP002074097 cited in the application see the whole document</p>	4,9
Y	<p>COSSET F.-L. ET AL.: "HIGH-TITER PACKAGING CELLS PRODUCING RECOMBINANT RETROVIRUSES RESISTANT TO HUMAN SERUM" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 12, 1 December 1995, pages 7430-7436, XP000569527 cited in the application see the whole document</p>	8
X	<p>MILLER N. ET AL.: "TARGETED VECTORS FOR GENE THERAPY" FASEB JOURNAL, vol. 9, no. 2, February 1995, pages 190-199, XP000616414 see page 190, right-hand column, line 20 - page 192, right-hand column, line 12</p>	1-3,6,7, 10-14
A	<p>WO 96 30533 A (BAVARIAN NORDIC RESEARCH INST ; SALMONS BRIAN (DE); BAUMANN JOERG () 3 October 1996 see the whole document</p>	1-14
A	<p>VON KALLE C. ET AL.: "Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector." BLOOD, vol. 84, no. 9, 1994, pages 2890-2897, XP000196799 see the whole document</p>	1-14
A	<p>TAKEUCHI Y. ET AL.: "Retroviral pseudotypes produced by rescue of a Moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses." VIROLOGY, vol. 186, 1992, pages 792-794, XP002074099 see the whole document</p>	1-14
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/00593

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SCHIERLE B. S. ET AL.: "Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells." PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 94, August 1997, pages 8640-8645, XP002074100 see the whole document ---	1-14
P,X	MAMMANO F. ET AL.: "Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 4, April 1997, pages 3341-3345, XP002074198 see the whole document -----	1-4,6,7, 9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/00593

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See Appendix
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/00593

OBSERVATION: Although Claim 11 and Claim 14, insofar as the preparation of the active substance is carried out in vivo, relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/00593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9630533 A	03-10-1996	AU 5274696 A EP 0817860 A	16-10-1996 14-01-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In' itionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00593

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SALMONS B. ET AL.: "CONSTRUCTION OF RETROVIRAL VECTORS FOR TARGETED DELIVERY AND EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES" LEUKEMIA, Bd. 9, Nr. SUPPL. 01, 1. Oktober 1995, Seiten S53-S60, XP000575934	1-3, 6, 7, 10-14
Y	siehe Seite S55, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite S56, linke Spalte, Absatz 1 siehe Seite S58, linke Spalte, Absatz 3 ---	4, 8, 9
Y	WILK T. ET AL.: "Retained in vitro activity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product." VIROLOGY, Bd. 189, 1992, Seiten 167-177, XP002074097 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	4, 9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. August 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/08/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	COSSET F.-L. ET AL.: "HIGH-TITER PACKAGING CELLS PRODUCING RECOMBINANT RETROVIRUSES RESISTANT TO HUMAN SERUM" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 12, 1. Dezember 1995, Seiten 7430-7436, XP000569527 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	8
X	MILLER N. ET AL.: "TARGETED VECTORS FOR GENE THERAPY" FASEB JOURNAL, Bd. 9, Nr. 2, Februar 1995, Seiten 190-199, XP000616414 siehe Seite 190, rechte Spalte, Zeile 20 - Seite 192, rechte Spalte, Zeile 12 ---	1-3,6,7, 10-14
A	WO 96 30533 A (BAVARIAN NORDIC RESEARCH INST ; SALMONS BRIAN (DE); BAUMANN JOERG ()) 3. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-14
A	VON KALLE C. ET AL.: "Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector." BLOOD, Bd. 84, Nr. 9, 1994, Seiten 2890-2897, XP000196799 siehe das ganze Dokument ---	1-14
A	TAKEUCHI Y. ET AL.: "Retroviral pseudotypes produced by rescue of a Moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses." VIROLOGY, Bd. 186, 1992, Seiten 792-794, XP002074099 siehe das ganze Dokument ---	1-14
P,X	SCHIERLE B. S. ET AL.: "Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells." PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 94, August 1997, Seiten 8640-8645, XP002074100 siehe das ganze Dokument --- -/--	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In itionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00593

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>MAMMANO F. ET AL.: "Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 71, Nr. 4, April 1997, Seiten 3341-3345, XP002074198 siehe das ganze Dokument -----</p>	<p>1-4,6,7, 9-14</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

...internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00593

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Siehe Anlage
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

BEMERKUNG: Obwohl Anspruch 11 und Anspruch 14, soweit die Bereitstellung des Wirkstoffes in vivo erfolgt, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In .tionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00593

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
W0 9630533 A	03-10-1996	AU 5274696 A	16-10-1996
		EP 0817860 A	14-01-1998
<hr/>			